

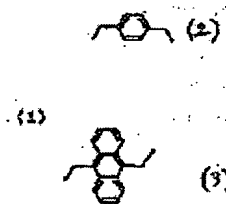
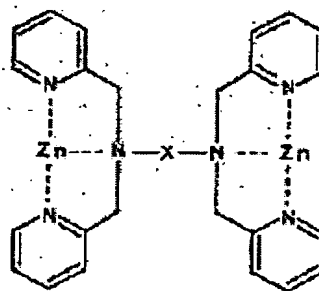
RECEPTOR COMPOUND FOR PROTEIN OR PEPTIDE

Patent number: JP2001253871
Publication date: 2001-09-18
Inventor: HAMACHI ITARU
Applicant: JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP
Classification:
- international: C07D213/36; G01N33/566
- european:
Application number: JP20000066132 20000310
Priority number(s):

Abstract of JP2001253871

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an artificial receptor compound capable of selectively identifying a specific protein or peptide.

SOLUTION: This receptor compound for protein or peptide is a metal complex expressed by formula (1) (X is, for example, an aromatic hydrocarbon group or a heterocyclic group each having methylene groups in two side chains and expressed by formulas 2, 3). The compound identifies protein or peptide of an α -helix structure having histidine residues existing in a specific recurring cycle and combines with it and has a character inducing a more regular α -helix structure.



Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-253871

(P2001-253871A)

(43) 公開日 平成13年9月18日 (2001.9.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 0 7 D 213/36		C 0 7 D 213/36	4 C 0 5 5
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	4 H 0 4 5
// C 0 7 K 7/08	Z N A	C 0 7 K 7/08	Z N A

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2000-66132(P2000-66132)

(22) 出願日 平成12年3月10日 (2000.3.10)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 浜地 格

福岡県福岡市早良区昭代2-8-8-504

(74) 代理人 100087675

弁理士 筒井 知

Fターム(参考) 4C055 AA15 BA02 BA27 BB01 BB04

BB10 CA01 CA02 CA27 CB10

DA01 EA03

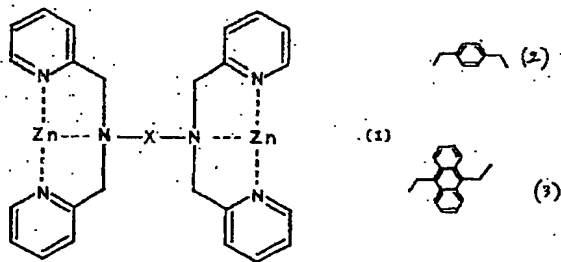
4H045 BA05 BA17

(54) 【発明の名称】 タンパク質またはペプチドのレセプター化合物

(57) 【要約】 (修正有)

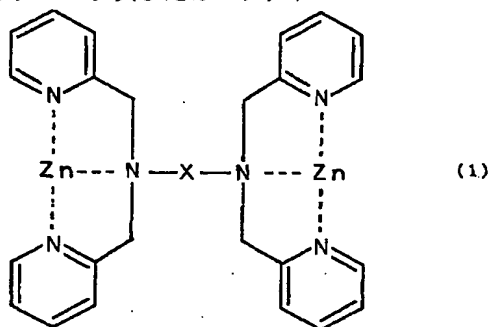
【課題】 特定のタンパク質またはペプチドを選択的に識別することのできる人工レセプター化合物を提供する。

【解決手段】 下記の一般式(1)で表わされる金属錯体から成ることを特徴とするタンパク質またはペプチドのレセプター化合物。〔式(1)中、Xは、例えば式2, 3で表される、2つの側端にメチレン基を有する芳香族炭化水素基または複素環基を表わす。〕特定の周期でヒスチジン残基が存在する α -ヘリックス構造のタンパク質またはペプチドを認識し、これに結合して、より規則的な α -ヘリックス構造を誘起する性質を有する。



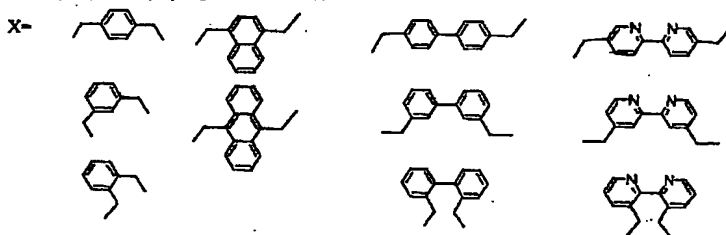
【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の一般式(1)で表わされる金属錯体から成ることを特徴とするタンパク質またはペプチド



〔式(1)中、Xは、2つの側端にメチレン基を有する芳香族炭化水素基または複素環基を表わす。〕

【請求項2】 Xが、下記の(2)に示すものの1つか



【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、人工レセプター化合物(合成レセプター分子)の分野に属し、特に、特定構造のタンパク質またはペプチドを選択的に認識し得るタンパク質またはペプチドのレセプター化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、生体系が示す高選択性で高精度の分子認識機能を模倣し、さらに、これを発展させた人工レセプターの研究が盛んに進められている。このような人工レセプター化合物は、生体内の諸プロセスや各種化学反応のメカニズム等を探究するための研究ツールとして利用されるとともに、その研究結果に基づき各種の機能素子、分離システム、薬剤などへの応用が期待されている。

【0003】これまで知られている人工レセプターは、低分子化合物を認識(識別)するためのものが多い。高分子化合物については、DNAを対象とする研究が盛んに展開されており、これを特定のDNAの検出系に応用した例なども見出される。しかし、タンパク質表面にある官能基を認識し結合する人工レセプターの研究は殆ど行われていないのが現状である。この理由は、タンパク質表面に存在する官能基は高度に溶媒和され複雑な形態を呈しているため、分子認識にとって困難な場になっているためと考えられる。

のレセプター化合物。

【化1】

ら選ばれることを特徴とするレセプター化合物。

【化2】

【0004】タンパク質またはペプチド、特に、その基本構造である α -ヘリックス構造から成る特定のタンパク質またはペプチドを選択的に認識し得るレセプターを得ることができれば、その特性を利用して生体内の反応機構などを解明するための強力な研究手段として用いるとともに、新しい薬剤、試薬、機能素子等への開発に資するものと期待されるが、その例は殆ど見当たらない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、これまで殆ど例が見られない、特定のタンパク質またはペプチドを選択的に識別することのできる人工レセプター化合物を提供することにある。

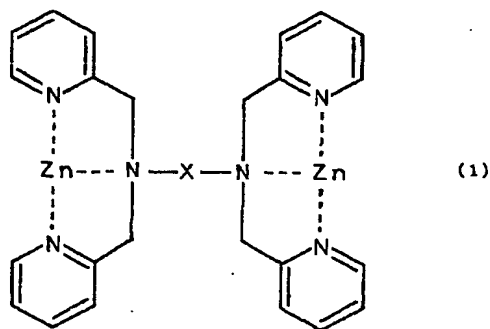
【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、2, 2'-ジピコリルアミン(以下、Dpaと略称することがある)が亜鉛などの遷移金属に対して三座の配位子として強く配位結合することに注目し、このDpaと亜鉛とから構成される亜鉛二核錯体型化合物から成る新しいタイプのタンパク質またはペプチドのレセプター化合物を設計、合成した。

【0007】かくして、本発明は、下記の一般式(1)で表わされる金属錯体から成ることを特徴とするタンパク質またはペプチドのレセプター化合物を提供するものである。

【0008】

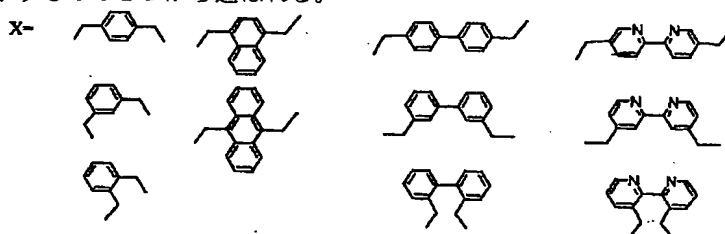
【化3】



ここで、式(1)中、Xは、2つの側端にメチレン基を有する芳香族炭化水素基または複素環基を表わし、好ましくは、下記の(2)に示すものの1つから選ばれる。

【0009】

【化4】



(2)

【0010】

【発明の実施の形態】本発明のタンパク質・ペプチドレセプター化合物を表わす式(1)においてXは、スペーサー部位を構成する。このスペーサーとなるXは、剛直性のある分子が好ましく、(2)に示されるように、2つの側端にメチレン基を有する各種の芳香族炭化水素基または複素環基から選ばれる。

【0011】式(1)で表わされるように、本発明のスペーサー化合物は、亜鉛の周りに配位した2つの2,2'-ジピコリルアミン(以下、Dpaと略称することがある)が、上記のごときスペーサー(X)を介して結合した構造から成る。この場合、Dpaは三座配位子であり、四面体構造をとる亜鉛イオンに対し高い会合定数(10^{-8}M^{-1})を示し、亜鉛イオンの1つの配位子が空位となっている。

【0012】このような亜鉛二核錯体型の本発明のレセプター化合物はスペーサー(X)によって画定される距離に応じて、特定の周期でヒスチジン残基を有するタンパク質またはペプチドに対し、上記のように空位のある亜鉛がヒスチジン残基に特異的に結合することにより、そのタンパク質またはペプチドを選択的に認識(識別)する機能を有する。例えば、スペーサーとしてp-キシレンを有する亜鉛二核錯体は、7個毎にヒスチジンが存在するアミノ酸配列を有するタンパク質またはペプチドに対して良好な認識能を示し、また、スペーサーとしてアントラセンを導入したものは4個毎にヒスチジン残基をもつタンパク質またはペプチドを選択的に認識し得る。

【0013】このようにして、本発明のレセプター化合

物は、水中において特定のタンパク質またはペプチド、すなわち、特定の周期でヒスチジン残基が存在し α -ヘリックス構造のタンパク質またはペプチドを認識し、亜鉛がヒスチジン残基のイミダゾール環に配位してそれぞれのヒスチジン残基に結合することにより、2つのヒスチジン残基間で該タンパク質またはペプチドを架橋して1:1の複合体を形成し、より規則性の高い α -ヘリックス構造を誘起する。これらのことは、後述の実施例に示すように、円偏光二色性(CD)スペクトルを測定することによって確かめられている。

【0014】式(1)で表わされる本発明のレセプター化合物は、既知の反応を工夫することにより容易に合成することができる。図1は、本発明のレセプター化合物の合成スキームを概示するものである。図1に示すように、スペーサー部位(X)のプロモ体(A)を得ることができれば、これを炭酸カリウムの存在下に2,2'-ジピコリルアミン(B)と反応させることにより、スペーサー部位(X)を介して2つのDpaが結合した合成レセプター分子(C)が生成される。レセプター化合物となる所望の金属錯体(1)を得るには、この合成レセプター分子(C)を亜鉛と混合するだけでよい。すなわち、亜鉛は配位子置換活性であるため、平衡が非常に速いので、適当な緩衝液(例えば、ホウ酸緩衝液)でpHを調整した水溶液中で、合成レセプター分子と亜鉛の塩(好ましくは硝酸亜鉛)を混合するだけで所望の錯体が形成される。

【0015】如上のように、本発明のレセプター化合物は、特定のアミノ酸配列を有するタンパク質またはペプチドを選択的に認識しこれに結合する性質を有するの

で、該アミノ酸配列をブロックすることにより、そのようなタンパク質やペプチドが関与する生体反応の機構解明や薬剤等の開発に当たって阻害剤として用いることができる。さらに、本発明のレセプター化合物は、そのような特定のタンパク質またはペプチドを検出したり分離する手段として応用展開される可能性も有する。

【0016】

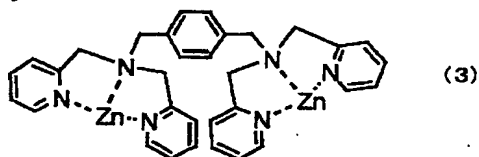
【実施例】以下に、本発明の特徴をさらに明らかにするために実施例に沿って本発明を説明するが、本発明はこの実施例によって制限されるものではない。なお、本明細書および図面中の構造式においては、当該分野で慣用されているように、炭素原子や水素原子を省略して示していることもある。

【0017】実施例1：p-キシレンビス（2，2'-ジピコリルアミン）と亜鉛錯体の合成

本発明に従うレセプター化合物として、スパーサーにp-キシレンを有し下記の式（3）で表わされる亜鉛二核錯体〔以下、pXyDpa（Zn）₂と略記する〕を合成した。

【0018】

【化5】



【0019】脱気窒素置換した100mlニロフラスコにp-キシレンジブロミド712mg（2.7mmol）、TBAI 0.2g（0.54mmol / 0.2eq）および炭酸カリウム1.1g（7.96mmol / 3eq）を加え、乾燥DMF 20mlに溶解させた。さらに、2，2'-ジピコリルアミン1.2g（6.0mmol / 2.2eq）を加え、50℃で攪拌

¹H-NMR（250MHz、CDCl₃、TMS、25℃）分析結果

δ / ppm	分裂 (J _H /Hz)	積分比	理論比	帰属
3.67	s	4.31	4H	5
3.81	s	7.11	8H	6
7.09	t	4.10	4H	2
7.36	d	4.94	4H	4
7.63	m	7.48	8H	3, 7
8.50	d	4.00※1)	4H	1

※1)基準値

【0022】

マスペクトル（ESI-TOF）分析結果

501.48

501.64[M+H]⁺

523.49

523.61[M+Na]⁺

【0023】

実測値 (m/z)

計算値

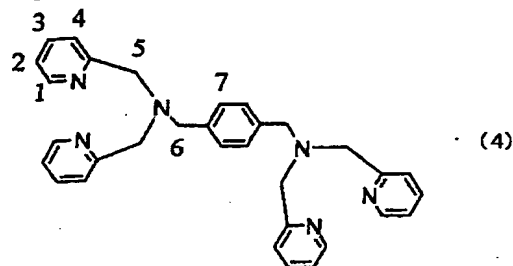
元素分析 (C₃₂H₃₂N₆+0.5H₂O) 分析結果

元素	H	C	N	C/N
----	---	---	---	-----

を開始した。TLC（シリカゲル、MeOH）による反応追跡により12時間後にp-キシレンジブロミドの消失を確認した。反応が完全に進行したことを確認するために、反応溶液から少量サンプリングし溶媒を減圧留去した。残渣にクロロホルム10mlを加え、蒸留水で5回洗浄操作を行った。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。さらに減圧乾燥を行い、¹H-NMR測定を行った。60時間後、残りの反応溶液についても同様の処理を行い、カラムクロマトグラフィー（シリカ、CHCl₃:MeOH:TEA=80:2:1）により精製し、橙黄色の化合物を得た。収量1.0g（74%）。¹H-NMR、マスペクトル分析（ESI-TOF-MS）、および元素分析により同定することにより下記の式（4）〔式中の数字は、後述の¹H-NMR分析における帰属位置を示すためのものである〕で表わされるp-キシレンビス（2，2'-ジピコリルアミン）（pXyDpa）が生成されたことを確認した。ホウ酸緩衝液でpH8.0に調整した水溶液中で、pXyDpaと硝酸亜鉛を混合することにより、目的のpXyDpa（Zn）₂を得た。

【0020】

【化6】



【0021】

実測値	6.36	75.36	16.35	4.61
計算値	6.48	75.44	16.50	4.57
Δ	-0.12	-0.08	-0.15	+0.04

【0024】実施例2：ペプチド結合実験

図2に示すようなアミノ酸配列を有するペプチドを用いて結合実験を行った。各ペプチドは、16残基のアミノ酸から構成され、 α -ヘリックス構造安定化のため、適当な位置にGlu-Lys（グルタミン酸残基-リシン残基）の導入、N末端のアセチル化による保護、C末端アミド型となっている。また、それぞれのペプチドには、レセプター分子の硝酸イオンと容易に配位子交換する金属配位能の高いHis（ヒスチジン残基）が異なる位置に存在する。すなわち、pep（15）は15位、pep（4, 15）は4位および15位、pep（8, 15）は8位および15位、pep（11, 15）は11位および15位に、それぞれ、ヒスチジン残基が存在する。

【0025】実施例1で合成したレセプターpXyDpa（Zn）₂を、pep（8, 15）ペプチドに添加しCDスペクトルを測定した。測定は、10mMのホウ酸緩衝液でpH8.0に調整した水溶液中で、ペプチド濃度を50 μ Mとし、これに0～5等量のpXyDpa（Zn）₂を添加し、4℃で行った。得られたCDスペクトルチャートを図3に示す。

【0026】図3に示されるように、pXyDpa（Zn）₂の添加により α -ヘリックス構造に特徴的な222nmのCD強度の減少および2, 2'-ジピコリルアミン由来の誘起CD（248nm、267nm）（図3右上の拡大図参照）が観測され、会合定数を算出するとlogK=4.5程度であることが明らかとなった。

【0027】さらに、連続変化法によるCDスペクトル測定により化学量論比の決定を行った。測定は、pep（8, 15）ペプチド+pXyDpa（Zn）₂の濃度を100 μ MとしpH8.0（10mMのホウ酸緩衝液）の水溶液中、4℃で行った。その結果を図4に示されるように、 α -ヘリックス由来の222nmおよび2, 2'-ジピコリルアミン由来の誘起CD（267nm）で評価したところ、いずれの場合でも0.5で最大値をとることから化学量論比は、1：1（ペプチド1molに対してレセプター1mol）であることが明らかとなった。

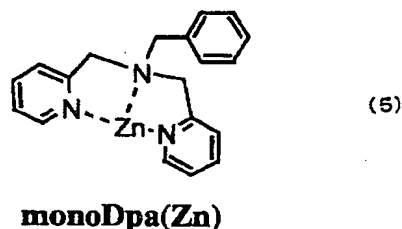
【0028】上記のようなCDスペクトル測定により、図2に示すHisの存在位置が異なる4種類のペプチドに対して、pXyDpa（Zn）₂を一等量添加した際のヘリックス含量の増加量を図5に示す。この際、コントロール化合物として2, 2'-ジピコリルアミンが一つ導入された下記の式（5）で示される化合物[monoDpa（Zn）]についても評価を行った。

【0029】図5に示されるように、本発明に従うレセプター化合物pXyDpa（Zn）₂は、特にHisが7個毎に導入されているペプチド（pep（8, 15））

に対して α -ヘリックス含量の増加が確認された。これは、pXyDpa（Zn）₂の2つの2, 2'-ジピコリルアミン亜鉛錯体がスパーサーを介してちょうどHisのイミダゾール環に配位し、ペプチドに架橋することで α -ヘリックス構造が誘起されたためと考えられる。この考察はコントロール化合物として評価したmonoDpa（Zn）では、Dpaが1つしか導入されておらずHisに配位しても架橋することができず、ペプチド（pep（8, 15））の α -ヘリックス構造が誘起されていないことから裏付けられる。

【0030】

【化7】

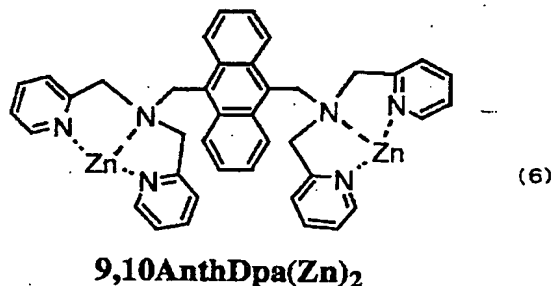


【0031】実施例3：ペプチド結合試験（その2）

下記の式（6）で表わされるようにスパーサーとして9位および10位の側端にメチレン基を有するアントラセンを導入したレセプター化合物[9, 10AnthDpa（Zn）₂]を合成し、実施例2と同様に、図2の4種類のペプチドに添加しヘリックス含量の増加を観察した。その結果を図6に示す。図6に示されるように、この場合は、特にHisが4個のアミノ毎に導入されているペプチド（pep（11, 15））に対して α -ヘリックス含量の増加が確認された。このように、本発明のアクセプター化合物は、スパーサーを変えることにより認識できるペプチドを変化させることができる。

【0032】

【化8】



【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のレセプター化合物となる亜鉛二核錯体の合成スキームを概示する。

【図2】本発明のレセプター化合物のペプチド認識能を調べる結合実験において用いたペプチドのアミノ酸配列

を示す。

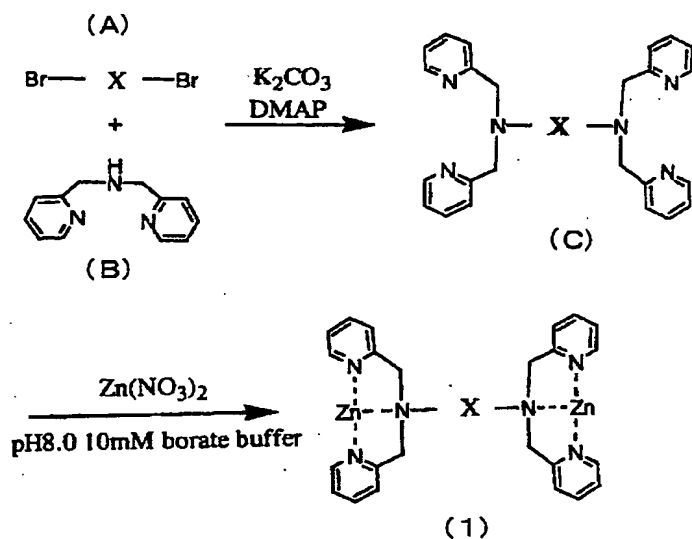
【図3】本発明のレセプター化合物とペプチドとの結合実験におけるCDスペクトルチャートの1例である。

【図4】本発明のレセプター化合物とペプチドとの結合実験において、それらの化学量論比を求めるために行った連続変化法によるCDスペクトルの強度変化を示す。

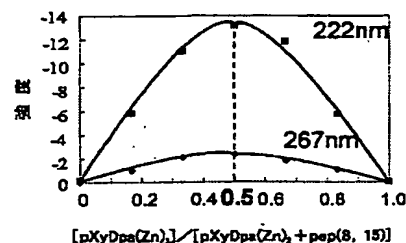
【図5】本発明のレセプター化合物が特定のアミノ酸配列のペプチドを認識して α -ヘリックス構造を誘起することを示す実験結果の1例である。

【図6】本発明のレセプター化合物が特定のアミノ酸配列のペプチドを認識して α -ヘリックス構造を誘起することを示す実験結果の別の1例である。

【図1】



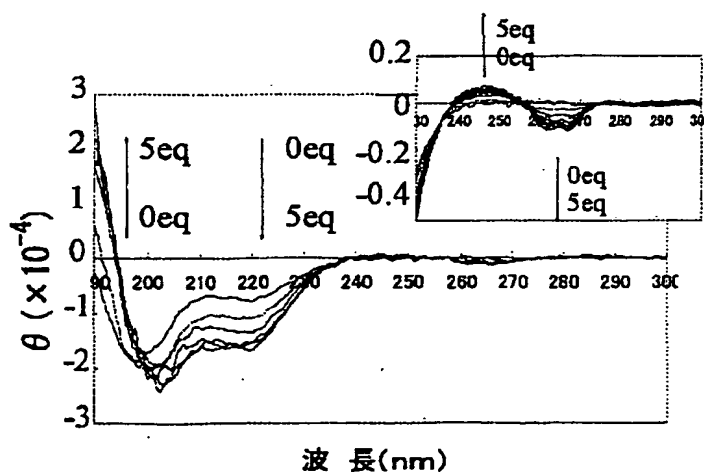
【図4】



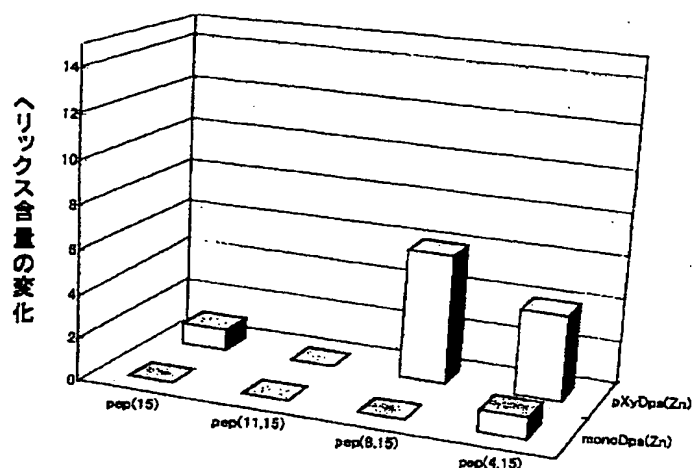
【図2】

	1	5	10	15
pep(15)	Ac-Ala-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-His-Ala-NH ₂			
pep(4,15)	Ac-Ala-Glu-Ala-His-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-His-Ala-NH ₂			
pep(8,15)	Ac-Ala-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-His-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-His-Ala-NH ₂			
pep(11,15)	Ac-Ala-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-His-Ala-Ala-Ala-His-Ala-NH ₂			

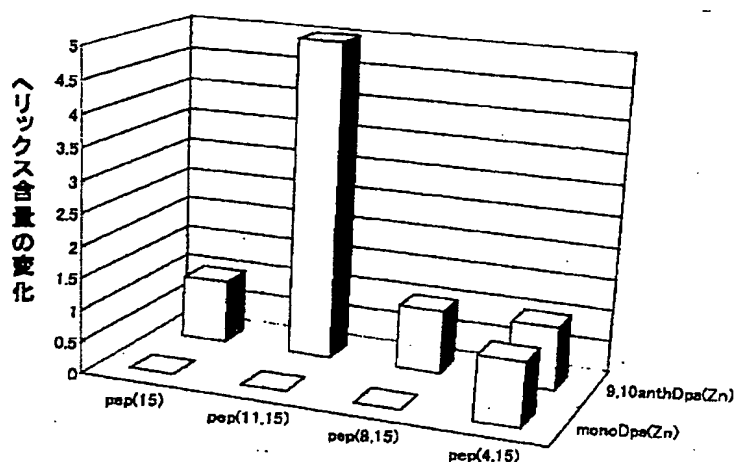
【図3】



【図5】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成12年12月5日（2000.12.5）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】実施例2：ペプチド結合実験

図2に示すようなアミノ酸配列を有するペプチドを用いて結合実験を行った。各ペプチドは、16残基のアミノ酸から構成され、 α -ヘリックス構造安定化のため、適当な位置にGlu-Lys（グルタミン酸残基-リシン残基）の導入、N末端のアセチル化による保護、C末端アミド型となっている。また、それぞれのペプチドには、

レセプター分子の硝酸イオンと容易に配位子交換する金属配位能の高いHis（ヒスチジン残基）が異なる位置に存在する。すなわち、pep(15)は15位、pep(4,15)は4位および15位、pep(8,15)は8位および15位、pep(11,15)は11位および15位に、それぞれ、ヒスチジン残基が存在する。なお、各ペプチドのアミノ酸配列は、pep(15)については配列番号：1、pep(4,15)については配列番号：2、pep(8,15)については配列番号：3、pep(11,15)については配列番号：4とする。

【手続補正2】

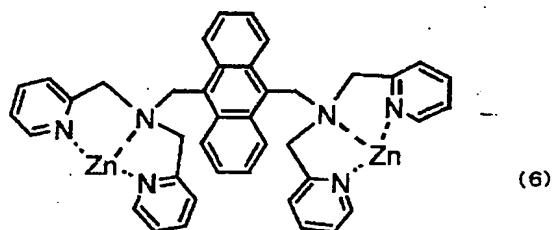
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【配列表】

【化8】



9,10AnthDpa(Zn)₂

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Receptor compounds for proteins or peptides

<130> P0125T

<140> JP2000-066132

<141> 2000-03-10

<160> 4

$\langle 210 \rangle$ 1

$\langle 211 \rangle$ 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 400 \rangle$ 1

Ala Glu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala His Ala
5 10 15

$\langle 210 \rangle$ 2

<211> 16

<212> PRT

〈213〉 Artificial Sequence

<400> 2

Ala Glu Ala His Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala His Ala
5 10 15

$\langle 210 \rangle$ 3

<211> 16

<212> PRT

〈213〉 Artificial Sequence

$\langle 400 \rangle$ 3

Ala Glu Ala Ala Lys Glu Ala His Ala Lys Glu Ala Ala Ala His Ala
5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

〈213〉 Artificial Sequence

<400> 4

Ala Glu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys His Ala Ala Ala His Ala
5 10 15